

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590293

研究課題名（和文） 選択的オートファジーによる細胞内クリアランスの制御

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of p62 degradation in selective autophagy

研究代表者

一村 義信 (ICHIMURA YOSHINOBU)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・首席研究員

研究者番号：80400993

研究成果の概要（和文）：

p62 は様々な細胞内シグナル伝達分子と相互作用し、その足場タンパク質として機能している。この p62 の細胞内存在量は基底レベルのオートファジーによる恒常的かつ選択的な分解で制御されている。酵母 Atg8p は、オートファゴソームの膜形成に機能するだけでなく、オートファジーの分解基質やそのレセプタータンパク質との相互作用を通して選択的オートファジーにおいても重要な役割を担うタンパク質として知られている。p62 についても Atg8p 動物ホモログの LC3 と直接相互作用することで、積極的にオートファゴソームに取り込まれ、リソソーム分解へ導かれている。酵母 Atg8p の動物ホモログには、LC3A、LC3B、LC3C、GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 の6つが存在し、それらはアミノ酸配列の相同性から、さらに LC3 と GABARAP の2つのファミリーに大別される。LC3、GABARAP ともにオートファゴソームの膜へ局在するが、その機能の重複や特異性については十分に理解されていない。今回、我々がおこなった相互作用解析の結果、p62 は GABARAP より LC3 と強く相互作用する結果が得られた。また、siRNA を用いて LC3 と GABARAP ファミリーの遺伝子発現をノックダウンしたところ、全てをノックダウンした細胞では、恒常的オートファジーによるバルク蛋白分解の遅延が認められた。興味深いことに、LC3 と GABARAP ファミリーの各々のノックダウンでは、恒常的オートファジーの分解活性は正常であるにもかかわらず、LC3 単独のノックダウン細胞でのみ p62 の蓄積が見られた。以上の結果は、通常状態で作動している恒常的オートファジーにおいて、LC3 と GABARAP はオートファゴソーム形成に関しては機能重複を示す一方、p62 の選択的オートファジー分解は、主として LC3 との相互作用を介して遂行されることを表している。

研究成果の概要（英文）：

p62 is a scaffold protein involved in multiple signaling pathways, and its intracellular levels are constitutively and selectively regulated by basal autophagy. In yeasts, Atg8p plays key roles in both autophagosome formation and selective autophagy based on its membrane fusion property and interaction with autophagy receptors/specific substrates. LC3, a mammalian Atg8 homolog, interacts directly with p62 by LIR (LC3 interacting region), highly conserved sequence among p62 homologs, and thus p62 is trapped into autophagosome. In contrast to the single Atg8p in yeast, mammals have 6 homologues of Atg8p comprising LC3 and GABARAP families. However, it is not clear these two families have different or similar functions. In this study, we found that simultaneous knockdown of LC3 and GABARAP families caused a defect in long-lived protein degradation through lysosomes, and knockdown of each had no effect on the degradation. Meanwhile, knockdown of LC3B but not GABARAPs resulted in significant accumulation of p62. These

results suggest that while mammalian Atg8 homologues are functionally redundant with regard to autophagosome formation, selective autophagy is regulated by specific Atg8 homologues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：選択的オートファジー、p62、LC3

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、またはアルコール性肝炎、脂肪肝、肝細胞癌などの肝疾患では、多くの場合、細胞内封入体（異常タンパク質の凝集体）の蓄積に伴い機能障害を呈する。細胞内で自己集合する p62 タンパクは、封入体形成の責任分子であり、その適切な代謝が封入体の蓄積を回避するためには重要である。p62 タンパクはオートファジーによる選択的分解を通じて恒常的に代謝されることが判明しているが、その仕組みについては完全には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、p62 の選択的オートファジー機構を分子レベルで解明し、分解制御因子を同定する。さらに、異常構造体蓄積を起因とする疾患に対する新たな治療法の提案に向けて、選択的オートファジーの分子機構原理を基盤とした細胞内凝集体除去システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

酵母 Atg8 の動物ホモログは LC3 と GABARAP の 2 つのファミリーで構成されている。本研究では、その各々と p62 との親和性をプルダウンアッセイ、および等温滴定量熱測定 (ITC) を用いて評価する。さらに、蛍光顕微鏡観察により p62 と強く共局在する Atg8 ホモログを見出し、先の結果との整合性を得る。また、Atg8 ホモログの各々をノックダウンした細胞で p62 の分解レベルを調査することで、p62 の選択的オートファジーに必要な不可欠な

Atg8 ホモログを見出す。以上の結果から、細胞内で恒常的に起きている p62 の選択的分解の分子メカニズムとその特異性の制御因子を明らかにする。

4. 研究成果

p62 と LC3 または p62 と GABARAP 複合体の立体構造モデルを構築、比較した。LC3, GABARAP の全体構造は、ともに N 末端に 2 つの α ヘリックスを持つユビキチンフォールドからなる。既に報告されている LC3 と GABARAP の構造上で大きく異なる特徴は LC3 の N 末端が塩基性の電荷表面を構成するのに対し、GABARAP は酸性電荷を提示する点にある。興味深いことに、p62 の LC3 相互作用領域 (LIR) に存在する酸性アミノ酸クラスターが特に LC3 の N 末端領域との相互作用で GABARAP のそれよりも有利に働くことが推測された。これを証明するため p62 に対する LC3 と GABARAP の相互作用解析を ITC およびプルダウンアッセイで評価した。

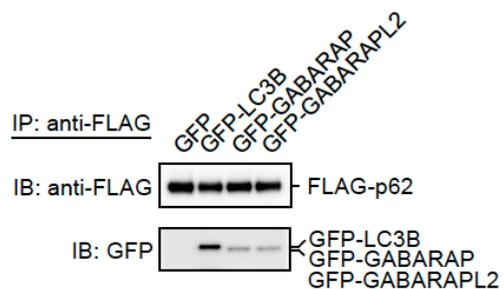


図 1

ITCにより得られた p62 に対する LC3 の Kd 値は GABARAP のものより明らかに低く、p62 と LC3 の親和性の高さを示していた。さらに FLAG-p62 からのプルダウンアッセイの結果は、LC3 が GABARAP よりも強く p62 と相互作用することを示していた (図 1)。

免疫蛍光染色で GFP-LC3 と GFP-GABARAP の細胞内局在を観察したところ、大部分の p62 の凝集体で LC3 との共局在がみられた。その一方で、GABARAP と p62 の共局在は一部であった (図 2)。

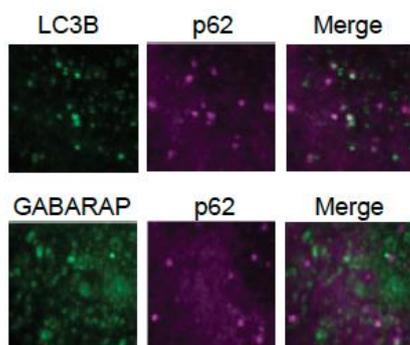


図 2

飢餓条件下では、LC3 や GABARAP は、そのほとんどがオートファゴソームに存在し、細胞質内に多数のドットを形成することが知られている。したがって、先の結果は、通常条件下で p62 がオートファゴソームへ局在化するためには主に LC3 がアダプター (もしくはレセプター) として働くことを示していた。

HEK293T の Atg8 ホモログの発現を RT-PCR、および Droplet Digital PCR で解析した結果、LC3B と GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 の発現が確認された。そこで、siRNA を用いて各々の遺伝子発現をノックダウンした細胞で p62 の分解効率を調べた。その結果、栄養条件下の基底レベルのオートファジーを介したバルク分解は、LC3B, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 の全てをノックダウンすることで低下がみられた。

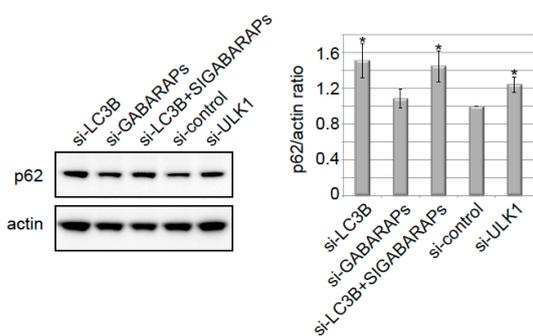


図 3

重要なことに、LC3B を単独でノックダウンした細胞はバルク分解が正常であるにも関わらず、p62 の分解遅延が引き起こされていた (図 3)。以上の結果は、少なくとも栄養条件下で起きる恒常的オートファジーにおいて、LC3 と GABARAP のいずれかが存在すれば、オートファゴソームは正常に形成されるが、p62 の分解は、LC3 との相互作用を介したオートファゴソームへの取り込みが重要であることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Komatsu M, Ichimura Y Involvement of ubiquitin system in mammalian autophagy 生化学、査読有、84、2012、472-478
- ② Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y, P62/SQSTM1/A170: Physiology and pathology. Pharmacolo Res. 査読有、2012、457-462
- ③ Ichimura Y, Komatsu M. Pathophysiological role of autophagy: lesson from autophagy-deficient mouse models. *Exp Anim.* 60、査読有、2012、329-345
- ④ Ushio H, Ueno T, Kojima Y, Komatsu M, Tanaka S, Yamamoto A, Ichimura Y, Ezaki J, Nishida K, Komazawa-Sakon S, Niyonsaba F, Ishii T, Yanagawa T, Kominami E, Ogawa H, Okumura K, Nakano H. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 査読有、2011、1267-1276

[学会発表] (計 4 件)

- ① International Symposium on Autophagy 2012 (沖縄県万国津梁館、2012 年 10 月 28 日-11 月 1 日) ポスター発表 “Phosphorylation of p62 robustly activates Nrf2 and contributes to tumor development”
- ② Gordon Research Conference (Autophagy in Stress, Development & Disease) 2012 (California USA、2012 年 3 月 11 日-16 日) ポスター発表 “Phenotypic analysis of *Atfy* KO mice”
- ③ 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 (パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日-16

- 日)ポスター発表 “Molecular mechanism of p62 turnover by constitutive autophagy”
- ④ 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 (神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 7 日-10 日)ポスター発表 “Molecular mechanism of p62 degradation in selective autophagy”

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/protein/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一村 義信 (ICHIMURA YOSHINOBU)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：80400993

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小松 雅明 (KOMATSU MASA AKI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号：90356254